

Microscopia direta de amostra de escarro concentrado em água sanitária para diagnóstico de tuberculose pulmonar

Bleach-concentrated direct sputum smear microscopy procedure for diagnosis of pulmonary tuberculosis in poverty areas

José L. O. Magalhães¹; Ana Albertina Araújo²; Leonardo O. Silva²; Ilyana O. Coutinho¹; Juliana F. C. Lima¹; Nilma C. Leal¹; Alzira M. P. Almeida¹

1. Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz, Recife, Pernambuco, Brasil. 2. Laboratório Municipal de Saúde Pública, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

Introdução: A tuberculose pulmonar causada por *Mycobacterium tuberculosis* é um grave problema de saúde pública que afeta mundialmente milhões de indivíduos. O desenvolvimento de métodos de diagnóstico fáceis e de baixo custo é essencial para o controle da doença nas áreas rurais remotas e de pobreza e entre os grupos vulneráveis. **Objetivo:** Avaliar a acurácia dos métodos laboratoriais para o diagnóstico de tuberculose pulmonar. **Material e métodos:** As amostras de escarro de pacientes com sinais e sintomas clínicos foram analisadas por microscopia após tratamento químico e sedimentação espontânea e comparadas com métodos empregados rotineiramente: baciloscopia direta do escarro, cultura e GeneXpert[®] MTB/RIF. **Resultados:** Das amostras analisadas, 16% foram positivas por microscopia nas amostras processadas; 18%, por cultura e Xpert[®] MTB/RIF; e 13%, por microscopia direta. As amostras processadas apresentaram um aumento de 31% de positividade (57 amostras) em relação à microscopia direta convencional. Na análise dos métodos avaliados, todos os resultados foram estatisticamente significativos, comprovando que não eram positivos ou negativos aleatoriamente e confirmando que há uma tendência para esses resultados. **Conclusão:** O tratamento químico e a sedimentação espontânea das amostras de escarro representam uma ferramenta diagnóstica eficaz nas situações em que tecnologias mais avançadas não são viáveis. Além da maior precisão e maior detecção de casos positivos em relação ao esfregaço direto, o procedimento reforça a biossegurança, diminuindo os riscos de contaminação aérea por *Mycobacterium tuberculosis* para profissionais de laboratório.

Unitermos: *Mycobacterium tuberculosis*; diagnóstico de tuberculose; escarro processado; método de microscopia com água sanitária.

ABSTRACT

Introduction: Pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* is a serious public health problem affecting millions of people worldwide. The development of easy and low-cost diagnostic methods is crucial for disease control in rural remote and poverty areas and among vulnerable groups. **Objective:** To evaluate the accuracy of laboratory methods for the diagnosis of Pulmonary tuberculosis. **Material and methods:** Sputum samples from patients with clinical signs and symptoms were analyzed by microscopy after chemical treatment and spontaneous sedimentation and compared with methods employed routinely: direct sputum smear microscopy, culture, and GeneXpert[®] MTB/RIF. **Results:** From the samples analyzed, 16% were positive by microscopy in the processed samples, 18% by both culture and Xpert[®] MTB/RIF, while 13% in the direct microscopy. The processed samples showed a 31% increase in positivity (57 samples) compared to conventional direct microscopy. In the analysis of the accuracy of the evaluated methods, all the results were statistically significant proving that they were not randomly positive or negative and confirming that there is a tendency for these results. **Conclusion:** Chemical treatment and spontaneous sedimentation of the

sputum samples procedure represent an effective diagnostic tool in situations where more advanced technologies are not feasible. Besides the higher accuracy and greater detection of positive cases regarding the direct smear, the procedure strengthens biosafety by decreasing the risks of aerial contamination by Mycobacterium tuberculosis for laboratory professionals.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; diagnosis tuberculosis; processed sputum; bleach microscopy method.

RESUMEN

Introducción: La tuberculosis pulmonar causada por Mycobacterium tuberculosis es un grave problema de salud pública que afecta millones de individuos en el mundo. El desarrollo de métodos de diagnóstico fáciles y de bajo costo es esencial para el control de la enfermedad en zonas rurales remotas y pobres y entre los grupos vulnerables. **Objetivo:** Evaluar la exactitud de métodos de laboratorio para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. **Material y métodos:** Las muestras del esputo de pacientes con signos y síntomas clínicos fueron analizadas por microscopía luego de tratamiento químico y sedimentación espontánea y comparados con métodos empleados ordinariamente: baciloscopia directa de esputo, cultivo y GeneXpert® MTB/RIF. **Resultados:** Entre las muestras analizadas, 16% fueron positivas por microscopía en las muestras procesadas; 18% por cultivo y Xpert® MTB/RIF; y 13% por microscopía directa. Las muestras procesadas presentaron un aumento de 31% de positividad (57 muestras) con respecto a la microscopía directa convencional. En el análisis de los métodos, todos los resultados fueron estadísticamente significativos, comprobando que no eran aleatoriamente positivos o negativos y confirmando que hay una tendencia para esos resultados. **Conclusión:** El tratamiento químico y la sedimentación espontánea de las muestras de esputo representan una herramienta diagnóstica eficaz en las situaciones en las cuales tecnologías más avanzadas no son viables. Además de la mayor precisión y mayor detección de casos positivos de lo que hace el frotis directo, el procedimiento fortalece la bioseguridad, disminuyendo los riesgos de contaminación del aire por Mycobacterium tuberculosis para el personal de laboratorio.

Palabras clave: Mycobacterium tuberculosis; diagnóstico de tuberculosis; esputo procesado; método de microscopía con hipoclorito de sodio.

INTRODUÇÃO

A tuberculose pulmonar (TBP) causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) afeta os seres humanos há milênios; é considerada uma das 10 principais causas de morte no mundo^(1,2), pois ainda acomete milhões de indivíduos anualmente.

Os casos ocorrem com mais frequência em aglomerações urbanas com baixo nível socioeconômico e más condições sanitárias. Os investimentos para diagnóstico e tratamento mais eficientes contribuíram, de certa forma, para diminuir a propagação da doença, mas ela continua sendo um sério problema de saúde pública mundial. Nos países desenvolvidos, as taxas de morbimortalidade por TBP estão em declínio. No entanto, nas regiões onde a prevalência do vírus da imunodeficiência humana/síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/Aids) é alta, o número de novos casos e mortes está aumentando⁽²⁾.

A doença pode ser diagnosticada por meio de história clínica, radiografia de tórax, tomografia computadorizada (TC) de tórax, broncoscopia, teste tuberculínico ou reação de Mantoux; contudo,

o diagnóstico conclusivo requer isolamento e identificação do *Mtb* por exames laboratoriais, como técnicas de microscopia direta por esfregaço, cultura e biologia molecular^(1,2). A cultura, devido a sua alta sensibilidade, é relatada na literatura como o padrão-ouro em comparação com a precisão de outros métodos para o diagnóstico da TBP. De acordo com os padrões do laboratório, seu limiar de detecção pode atingir 10 bacilos/ml do escarro, porém, tem a desvantagem de ser uma metodologia complexa, trabalhosa e demorada, que leva de 8-12 semanas para notificar um resultado negativo de crescimento de *Mtb*, além de necessitar de instalações laboratoriais complexas e condições de nível de contenção ou biossegurança 3 (NB-3)^(2,3).

Os novos métodos de diagnóstico que utilizam plataformas automatizadas, como o sistema GeneXpert® MTB/RIF, apresentam alta sensibilidade e especificidade para detectar a resistência tanto do *Mtb* quanto do medicamento em amostras do escarro e fornecer os resultados rapidamente em até 2 horas⁽⁴⁾. A sensibilidade do teste é de aproximadamente 68% a 72% em indivíduos com baciloscopia negativa e 98% entre indivíduos com *Mtb* com baciloscopia positiva^(4,5).

A microscopia direta de esfregaço [(DSSM), do inglês *direct sputum smear microscopy by conventional method*] é um método simples, rápido e de baixo custo muito utilizado para pesquisa de *Mtb* em pacientes clinicamente suspeitos de TBP, sobretudo em locais com acesso restrito a outros métodos de diagnóstico. No entanto, muitos pacientes com TBP ativos permanecem negativos, principalmente os casos paucibacilares, como crianças e indivíduos coinfectados por HIV/Aids. O limiar de detecção do DSSM é de 5.000 a 10.000 bacilos/ml do escarro. De acordo com a qualidade e o número de amostras por paciente, além das habilidades do técnico, a sensibilidade do DSSM pode chegar a 90%⁽²⁾.

Vários estudos foram realizados com o objetivo de aumentar a sensibilidade do DSSM; os resultados foram variados e os protocolos desenvolvidos não foram amplamente implementados nas práticas da rotina laboratorial para o diagnóstico de TBP⁽⁶⁻⁹⁾. Portanto, o desenvolvimento de metodologias mais fáceis e de baixo custo para uso em locais de recursos limitados é obrigatório.

Este estudo avaliou a precisão de um DSSM modificado, com tratamento químico prévio de amostras do escarro com água sanitária [hipoclorito de sódio (NaClO)] e sedimentação espontânea, em comparação com métodos de rotina (cultura, Xpert[®] MTB/RIF e DSSM convencional) utilizados por serviços de laboratório da saúde pública para diagnóstico de TBP.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Uma amostra de conveniência de espécimes do escarro foi coletada de indivíduos com sinais e sintomas de TBP nas unidades de saúde de Recife, Pernambuco, Brasil. Uma alíquota de cada amostra foi utilizada imediatamente para baciloscopia direta convencional, bem como para inoculação da cultura e análises moleculares pelo sistema Xpert[®] MTB/RIF (Cepheid Inc Sunnyvale, CA, EUA); a porção restante do escarro foi utilizada para o método DSSM modificado, com tratamento químico com água sanitária comercial, conforme descrito a seguir.

Microscopia direta de esfregaço do escarro pelo método convencional (cDSSM)

A cDSSM foi realizada conforme descrito anteriormente⁽¹⁰⁾. As amostras do escarro foram observadas macroscopicamente em uma capela de segurança biológica (classe II-B2) e porções mucosas mais espessas com palitos aplicadores de bambu foram

colhidas e espalhadas em lâminas de vidro. Os esfregaços foram secos ao ar à temperatura ambiente, fixados pelo calor da chama de uma lamparina a álcool e corados pela técnica padrão de Ziehl-Neelsen, com produtos Laborclin (Pinhais, Paraná, Brasil).

As leituras foram realizadas em um microscópio de campo claro com uma lente objetiva 100× óleo; os resultados foram registrados com base no esquema de pontuação padrão para a identificação de bacilos álcool-ácido resistente (BAAR), como se segue: negativo (nenhum BAAR observado em 100 campos); 1-9 BAAR (1-9 BAAR em 100 campos); 1+ (10-99 BAAR em 100 campos); 2+ (1-10 BAAR por campo, após verificar 50 campos); 3+ (mais de 10 BAAR por campo após verificação de 20 campos)⁽¹⁰⁾.

Cultura das amostras do escarro

As culturas foram realizadas no meio Ogawa-Kudoh (Laborclin – Pinhais, Paraná, Brasil), de acordo com o procedimento habitual⁽¹⁰⁾. Para cada amostra, um suabe impregnado com a porção mais purulenta do escarro foi introduzido em um tubo estéril contendo 3 ml de solução de NaOH a 4% por dois minutos para descontaminação; depois, foi espalhado sobre a superfície do meio de cultura. As culturas foram incubadas a 37°C e observadas após 48 horas para verificação do crescimento bacteriano, pois, nesta fase, isso é um indicativo de contaminação. As culturas foram observadas semanalmente por até 60 dias para acompanhar o desenvolvimento das características das colônias de *Mtb*, como tempo de crescimento e aspectos morfológicos. A identificação de *Mtb* foi confirmada por propriedades de resistência ao álcool e ao ácido, detecção do fator corda, reações bioquímicas da niacina, catalase, nitrato redutase, ácido β-nitrobenzoico (PNB) e hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH) e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.

Análise do sistema GeneXpert[®] MTB/RIF

Para o teste GeneXpert[®] MTB/RIF (Cepheid Inc Sunnyvale, CA, EUA), cada amostra do escarro foi inicialmente tratada com um reagente com NaOH e isopropanol. A amostra foi então transferida manualmente para um cartucho de uso único, preenchido com a mistura de reação. O cartucho é inserido no equipamento que executa automaticamente as etapas de extração, amplificação e detecção do ácido desoxirribonucleico (DNA). Os resultados são gerados automaticamente na tela, como *Mtb* negativo ou positivo (com uma estimativa semiquantitativa da concentração registrada, como baixa a média ou alta e sensível ou resistente à rifampicina)^(4,5).

Microscopia direta com esfregaço do escarro concentrado em água sanitária (BC-DSSM)

A microscopia direta com esfregaço do escarro concentrado em água sanitária foi realizada seguindo o procedimento descrito anteriormente⁽¹¹⁾. Após a preparação do esfregaço do escarro convencional, a amostra do escarro remanescente foi misturada com uma solução de água sanitária de hipoclorito de sódio comercial a 2%-2,5% (Brilux, Paulista, Pernambuco, Brasil), em volume igual a duas vezes o volume no recipiente e homogeneizada suavemente para evitar derramamento; a mistura foi então deixada por aproximadamente 10 minutos para inativação do *Mtb* ou de outras bactérias contaminantes. Em seguida, foi vertida diretamente em um tubo cônico de tampa de rosca de 12 ml, bem misturada para melhorar a digestão química do material orgânico e mantida à temperatura ambiente durante a noite (12 a 18 horas) para sedimentação espontânea. Logo após, o sobrenadante foi descartado. O depósito restante foi vigorosamente misturado, a tampa foi descartada e o tubo aberto foi invertido no centro de uma lâmina de vidro e deixado até que seu conteúdo fosse completamente drenado na superfície da lâmina. As amostras foram espalhadas sobre a lâmina usando a boca do tubo. Os esfregaços foram secos ao ar à temperatura ambiente, corados e registrados como descrito^(10,11).

Análise estatística

Os resultados foram lançados em um banco de dados construído no SPSS 20.0 para Windows e analisados pelos programas Open Epi14 e SPSS para calcular a precisão dos dados [sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e precisão]. O teste qui-quadrado foi utilizado para avaliar a dependência das variáveis. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo⁽¹²⁾.

ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Aggeu Magalhães (CEP-IAM) – Fiocruz/PE (CAAE 57175616.9.0000.5190) com o consentimento das unidades de saúde da Secretaria Municipal de Saúde de Recife, Pernambuco, Brasil.

RESULTADOS

As amostras do escarro foram analisadas por GeneXpert® MTB/RIF ($n = 1.346$), cultura ($n = 1.332$) e esfregaço do escarro

direto convencional e processado ($n = 1.348$). A diferença no número de amostras foi devida à exclusão de algumas culturas contaminadas para o cálculo da precisão, com cultura como padrão-ouro. A precisão das quatro metodologias foi analisada estatisticamente. Os resultados são mostrados nas **Tabelas 1, 2 e 3**. Houve crescimento de *Mtb* (culturas positivas) em 18% (235/1.332) das amostras do escarro; 13% das amostras (171/1.332) foram positivas para BAAR por esfregaço direto do escarro; 16% (213/1.332), por esfregaço processado do escarro, e 18% (234/1.332), por GeneXpert® MTB/RIF (Tabela 1).

Comparando o desempenho do esfregaço do escarro direto concentrado em água sanitária e do GeneXpert® MTB/RIF com a cultura, observamos que, das amostras positivas para a cultura, 73% (171/235) foram positivas para BAAR e 27% (64/235), negativas (falso negativas) por microscopia direta do esfregaço do escarro (Tabela 1). Das 1.332 amostras examinadas, a

TABELA 1 – Comparações dos resultados obtidos por microscopia direta de baciloscopia pelo método convencional, cultura, análise do sistema GeneXpert® MTB/RIF e microscopia direta de baciloscopia com concentrado de água sanitária

cDSSM	Cultura		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	171	10	181
Negativa	64	1.087	1.151
Total	235	1.097	1.332
BC-DSSM	Cultura		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	213	22	235
Negativa	22	1.075	1.097
Total	235	1.097	1.332
Gene Xpert	Cultura		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	212	32	244
Negativa	22	1.066	1.088
Total	234	1.097	1.331
cDSSM	Gene Xpert		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	176	9	185
Negativa	79	1.082	1.161
Total	255	1.091	1.346
BC-DSSM	Gene Xpert		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	223	32	255
Negativa	19	1.072	1.091
Total	242	1.104	1.346
BC-DSSM	cDSSM		
	Positiva	Negativa	Total
Positiva	186	57	243
Negativa	0	1.105	1.105
Total	186	1.162	1.348

cDSSM: microscopia direta de escarro pelo método convencional (do inglês: conventional direct sputum smear microscopy); BC-DSSM: microscopia direta de esfregaço de escarro processada pelo método de concentrado de água sanitária (do inglês: bleach-concentrated processing direct sputum smear microscopy); GeneXpert: ensaio molecular rápido.

TABELA 2 – Associação das contagens de BAAR na microscopia direta de esfregaço de escarro com concentrado de água sanitária com culturas positivas ou negativas

BC-DSSM	Cultura		Total
	Positiva	Negativa	
1-9 BAAR	9	3	12
1+	67	12	79
2+	66	7	73
3+	71	0	71
Negativa	22	1.075	1.097
Total	235	1.096	1.332

cDSSM: microscopia direta de escarro pelo método convencional (do inglês: conventional direct sputum smear microscopy); BAAR: bacilos ácido-rápidos; 1-9 BAAR: 1-9 BAAR em 100 campos; 1+: 10-99 BAAR em 100 campos; 2+: 1-10 BAAR em 50 campos; 3+: > 10 BAAR em 20 campos.

TABELA 3 – Avaliação da precisão de quatro métodos laboratoriais para o diagnóstico de tuberculose pulmonar

Comparações	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Precision	Kappa
cDSSM × Cultura	73%	99%	95%	94%	94%	79%
IC	67-78	98-99	90-97	93-96	93.1-96	$p < 0,001$
BC-DSSM × Cultura	91%	98%	91%	98%	97%	54%
IC	86-94	97-99	86-94	97-99	96-98	$p < 0,001$
GeneXpert × Cultura	91%	97%	87%	98%	96%	86%
IC	86-94	96-98	82-91	97-99	95-97	$p < 0,001$
cDSSM × Gene Xpert	69%	99%	95%	93%	93%	76%
IC	63-74	98-99.6	91-97	92-95	92-95	$p < 0,001$
BC-DSSM × GeneXpert	97%	92%	98%	87%	96%	87%
IC	96-98	88-95	97-99	80-91	95-97	$p < 0,001$
cDSSM × BC-DSSM	100%	95%	76.5%	100%	96%	84%
IC	98-100	94-96	71-81	99.7-100	95-97	$p < 0,001$

cDSSM: microscopia direta de escarro pelo método convencional (do inglês: conventional direct sputum smear microscopy); BC-DSSM: microscopia direta de esfregaço de escarro processada pelo método de concentrado de água sanitária (do inglês: bleach-concentrated processing direct sputum smear microscopy); GeneXpert: ensaio molecular rápido; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; IC: intervalo de confiança de 95%, inferior-superior.

positividade direta no esfregaço do escarro foi de 13%. Quanto a BC-DSSM, 81% (191/235) das amostras foram positivas para BAAR e 19% (44/235), negativas (falso negativas). Por outro lado, 22 amostras do escarro de cultura negativa foram positivas por BC-DSSM, totalizando 213 amostras positivas. Das 1.332 amostras processadas do escarro, 16% foram positivas (Tabela 1).

Sobre os resultados divergentes, as culturas foram negativas em três das 12 amostras paucibacilares (1-9 campos microscópicos BAAR/100); em 12 de 79 amostras positivas 1+ e em sete das 73 amostras positivas 2+ pela BC-DSSM. Houve total concordância entre o método padrão-ouro de cultura e a BC-DSSM em 71 amostras positivas 3+ (Tabela 2). Em relação às 1.332 amostras analisadas por cultura e GeneXpert® MTB/RIF, 212 (16%)

foram positivas e 1.066 (80%), negativas pelos dois métodos; 22 amostras positivas para a cultura foram negativas para GeneXpert® MTB/RIF e 32 amostras negativas para a cultura foram positivas para Xpert® MTB/RIF. No total, havia 234 amostras positivas para cultura e 244 amostras positivas para Xpert® MTB/RIF. Para o cálculo da precisão, as amostras positivas para Xpert® MTB/RIF/negativas para cultura foram consideradas falso negativas. O teste Xpert® MTB/RIF foi inconclusivo em uma das 235 amostras positivas para a cultura, e 234 culturas restantes para a comparação foram desconsideradas.

Na comparação de 1.346 amostras analisadas por esfregaço do escarro direto e processado com Xpert® MTB/RIF, 255 (19%) foram positivas para Xpert® MTB/RIF. Entre estas, 176 (69%) foram positivas e 79 (31%), negativas (falso negativas) por esfregaço direto; 223 (87%) foram positivas e 32 (13%), negativas (falso negativas) por esfregaço processado do escarro. Nove das 1.091 (0,008%) amostras negativas de Xpert® MTB/RIF foram positivas pelo esfregaço do escarro direto e processado. Entre as 255 amostras positivas para Xpert® MTB/RIF, 47 (18%) foram mais positivas pelo esfregaço do escarro processado do que pelo direto.

Na comparação entre esfregaço do escarro direto e processado entre 1.348 amostras, 186 (13,8%) foram positivas pelo esfregaço direto e 243 (18%), pelo esfregaço do escarro processado. Houve concordância entre os resultados negativos para o BAAR em 1.105 (82%) amostras. Cinquenta e sete amostras foram mais positivas pelo esfregaço do escarro processado do que pelo esfregaço do escarro direto, o que corresponde a um aumento de 31% da positividade. Sensibilidade, especificidade, VPP, VPN, precisão e intervalo de confiança (IC) de 95% são apresentados na Tabela 3. A sensibilidade, a especificidade e a concordância entre os testes foram satisfatórias, e o índice Kappa foi acima de 50% (Tabela 3). Na análise da precisão dos métodos avaliados, todos os resultados foram estatisticamente significantes.

DISCUSSÃO

Os pacientes com TBP são os disseminadores mais importantes da infecção na comunidade. Portanto, identificar e tratar os portadores é o primeiro passo para controlar a doença e interromper a transmissão inter-humana⁽²⁾.

Os avanços tecnológicos forneceram testes rápidos automatizados para diagnóstico laboratorial de TBP com alta sensibilidade, especificidade e rapidez e apresentaram informações sobre a resistência aos medicamentos^(4, 5, 13).

Embora pouco sensível, a microscopia convencional de esfregação do escarro ainda é um método valioso para a detecção da TBP ativa, especialmente nos países em desenvolvimento. A sensibilidade do esfregação direto no escarro é muito aprimorada dependendo dos padrões laboratoriais apropriados e das habilidades do profissional⁽²⁾. Com o objetivo de aperfeiçoar o desempenho da microscopia convencional direta de esfregação do escarro, várias tentativas foram feitas, utilizando tratamento químico, como o NaClO em diferentes concentrações e tempos, seguido por centrifugação ou sedimentação espontânea com resultados variados^(6-9, 13).

Neste estudo, a microscopia de amostras concentradas em água sanitária do escarro de pacientes com sinais e sintomas de TBP foi avaliada e comparada com a microscopia convencional de escarro, cultura e testes do sistema Xpert[®] MTB/RIF. De 235 (18%) amostras positivas para a cultura (verdadeiro positivos), a microscopia convencional de esfregação do escarro detectou BAAR em apenas 171 (73%). Assim, com base apenas no diagnóstico direto da baciloscopia do escarro, 27% dos pacientes com TBP ativa seriam classificados como negativos para BAAR. A estimativa é que um portador possa transmitir a infecção para 10 a 15 indivíduos por contato direto; após um ano, outros 600 indivíduos seriam infectados⁽²⁾.

Em relação aos resultados da BC-DSSM das amostras positivas de cultura, houve concordância na maioria deles (81%). No entanto, a positividade das amostras concentradas de água sanitária foi menor que a das culturas, considerada o teste padrão-ouro. Por outro lado, a BC-DSSM foi capaz de detectar *Mtb* em 22 casos de TBP, cujas amostras cultivadas foram negativas. Essa discordância pode ser devida ao procedimento de descontaminação do escarro. Para a inoculação da cultura, o escarro é tratado previamente com NaOH a 4%, e a alcalinidade prejudica a viabilidade e o crescimento do *Mtb* no meio de cultura. Além disso, apenas uma alíquota muito pequena do escarro é utilizada para o método de cultura Ogawa-Kudoh, no qual um suabe impregnado pelo escarro é inoculado diretamente na superfície do meio⁽¹⁴⁾. Apesar disso, o meio Ogawa-Kudoh apresenta alta sensibilidade e especificidade quando comparado com outros meios de cultura *Mycobacterium*^(14, 15). A detecção microscópica de BAAR nas amostras negativas para cultura pode ser enganosa por conta da presença de BAAR não tuberculoso do complexo *Mtb* (CMtb), que não cresce no meio específico para o *Mtb*⁽¹⁰⁾.

Os resultados negativos pela BC-DSSM de 44 amostras positivas de cultura não surpreendem. Como as culturas foram realizadas antes dos esfregações do escarro direto e concentrado em água sanitária, a possibilidade de consumo das porções mais ricas em bacilos não é descartada, resultando em baciloscopia negativa.

Ainda em relação à cultura, a positividade da BC-DSSM foi 9% maior que a do esfregação direto no escarro. Na análise de precisão, ao adicionar os 22 casos positivos de BC-DSSM nas amostras negativas para cultura, o esfregação do escarro concentrado em água sanitária detectou BAAR em 213 das 1.332 amostras analisadas, ou 16%, o que é muito próximo dos resultados da cultura (18%).

Quanto à acurácia, o desempenho da cultura foi melhor que o do esfregação do escarro direto e concentrado em água sanitária, mas o desempenho da BC-DSSM foi melhor do que o do esfregação do escarro direto convencional. Houve discordância em 22 amostras positivas para a cultura negativa pelo Xpert[®] MTB/RIF. Como discutido anteriormente, isso também pode ser enganoso devido à presença de BAAR não tuberculoso do CMtb, exibindo as mesmas características morfológicas e de coloração, mas que não são detectáveis pelo sistema Xpert[®] MTB/RIF⁽⁴⁾.

Para a determinação da precisão, as 32 amostras positivas para Xpert[®] MTB/RIF e negativas para cultura foram consideradas falso negativas. O resultado positivo do Xpert[®] MTB/RIF confirma a presença do *Mtb* na amostra. No entanto, isso não garante que eles estejam vivos, uma vez que a reação em cadeia da polimerase (PCR) identifica o DNA de microrganismos viáveis e não viáveis⁽⁴⁾. Portanto, a precisão do sistema Xpert[®] MTB/RIF foi superior à da cultura. Considerando o Xpert[®] MTB/RIF como padrão-ouro, a sensibilidade da cultura foi de 96%.

Na análise da precisão dos métodos avaliados, todos os resultados foram estatisticamente significativos, comprovando que não eram aleatoriamente positivos ou negativos e confirmando que há uma tendência para esses resultados. A sensibilidade, a especificidade e a concordância entre os testes foram satisfatórias, e o índice Kappa foi acima de 50% (Tabela 3).

O esfregação direto convencional do escarro foi utilizado como padrão para os cálculos de precisão e o incremento da positividade; o BC-DSSM reproduziu todos os resultados positivos do esfregação direto do escarro. Ou seja, nenhum esfregação direto positivo foi negativo pelo esfregação do escarro processado. Além disso, houve um incremento de 57 esfregações do escarro processados positivos nas amostras negativas diretas. A lógica é que o passo da concentração dos bacilos aumenta a probabilidade de ser positivo. Ao comparar as técnicas de esfregação do escarro direto e concentrado em água sanitária com o Xpert[®] MTB/RIF, ocorreram tanto Xpert[®] MTB/RIF negativo e BC-DSSM positivo quanto Xpert[®] MTB/RIF positivo e BC-DSSM negativo. Isso também pode acontecer devido à presença de outros BAAR não tuberculosos do CMtb com as características morfológicas e de coloração do *Mtb*, mas não detectados pelo Xpert[®] MTB/RIF^(10, 11).

Estudos anteriores com o objetivo de melhorar o desempenho do esfregaço direto no escarro convencional por tratamento químico do escarro tiveram resultados bastante variados⁽⁶⁻⁹⁾. Nosso estudo mostrou uma positividade aumentada em 9% em relação ao esfregaço direto convencional do esfregaço do escarro pelo tratamento das amostras com hipoclorito de sódio comercial. O esfregaço e a cultura do escarro concentrados de água sanitária tiveram uma precisão diagnóstica comparável. Essa é uma melhora muito boa para a identificação de casos de TBP perdidos pelo esfregaço do escarro direto convencional. Outra vantagem do método BC-DSSM é o aumento da segurança dos profissionais de laboratório^(16, 17). O NaClO prejudica a viabilidade do *Mtb* e, portanto, reduz o risco de contaminação pela geração de aerossóis. Ademais, o NaClO promove a dissolução de partículas do escarro (muco, saliva), favorecendo a precipitação espontânea do *Mtb*, mantendo suas propriedades morfológicas e de coloração. A digestão das partículas do escarro garante um campo microscópico mais limpo, o que favorece a identificação bacteriana^(10, 18).

Como desvantagem, a digestão com NaClO dificulta a aderência do esfregaço à lâmina, que pode ser facilmente lavada durante a coloração⁽¹⁰⁾. Em nosso trabalho, esse problema foi contornado pela diminuição do tempo de coloração com fucsina para 3 minutos, sem causar viés nos resultados da coloração.

Finalmente, o tratamento químico e a sedimentação espontânea do escarro não apenas preservam as vantagens do esfregaço direto convencional, como também aumentam consideravelmente a identificação de BAAR em amostras negativas

de esfregaço direto. Devido à simplicidade do procedimento, que não requer o uso de centrífugas, e à facilidade de acesso e baixo custo do produto químico, é viável a prática em laboratórios de unidades básicas de saúde.

O procedimento de microscopia do esfregaço do escarro concentrado em água sanitária fortalece a biossegurança com a redução dos riscos de contaminação aérea pelo *Mtb* e é mais preciso quando comparado com o esfregaço do escarro direto, permitindo maior detecção de casos positivos. O procedimento pode ser particularmente útil para indivíduos paucibacilares, como crianças ou pacientes com HIV/doenças sexualmente transmissíveis (DST). Além disso, nas áreas de pobreza, onde tecnologias mais avançadas não estão disponíveis, a execução do procedimento na rotina de diagnóstico da TBP é extremamente adequada.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Danilo Elias Xavier pela revisão crítica do manuscrito.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Sulis G, Roggi A, Matteelli A, Raviglione MC. Tuberculosis: epidemiology and control. *Mediterr J Hematol Infect Dis* [Internet]. 2014; 6(1): e2014070. Disponível em: <https://www.mjhid.org/index.php/mjhid/article/view/2014.070>.
2. World Health Organization. Global health TB report [Internet]. 2018. Disponível em: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
3. CDC. US Department of health and human services-biosafety in microbiological and biomedical laboratories. *Public Heal Serv* [Internet]. 2009; 5 edição (revisado em dezembro): 438. Disponível em: <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm>.
4. World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert Mtb/Rif System Policy Statement; 2011.
5. Lawn SD, Nicol MP. Xpert[®] MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future Microbiol* [Internet]. 2011; 6(9): 106782. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21958145>.
6. Steingart KR, Ng V, Henry M, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2006; 6(10): 664-74. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008175>.
7. Anagaw B, Mulu A, Abate E, et al. Improved detection of acid-fast bacilli in sputum by the bleach-concentration technique at Gondar University Teaching Hospital, northwest Ethiopia. *Ethiop Med J* [Internet]. 2012; 50(4): 349-54. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23930480>.
8. Makaan J, Maure T. Bleach processed smear for acid fast bacilli staining in Papua New Guinea. *Lab Med* [Internet]. 2014; 45(4): e140-1. Disponível em: <https://academic.oup.com/labmed/article-lookup/doi/10.1309/LMN45Y0ZMNPCLRMS>.
9. Rasool G, Riaz M, Mahmood Z, Mohy-Ud-Din R, Akhtar J, Javed I. Effects of household bleach on sputum smear microscopy to concentrate acid fast bacilli for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Biol Regul Homeost Agents* [Internet]. 2018; 32(3): 607-11. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29921388>.

10. Lumb R, van Deun A, Bastian I, Fitz-Gerald M. Laboratory diagnosis of tuberculosis by sputum microscopy. Adelaide: SA Pathology; 2013.
11. Magalhães JLO, Lima JFC, Araújo AA, et al. Microscopic detection of *Mycobacterium tuberculosis* in direct or processed sputum smears. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2018 [citado em 18 jun 2019]; 51(2): 237-9. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822018000200237&lng=en&tlng=en.
12. Sullivan KM, Dean A, Soe MM. OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health. *Public Health Rep* [Internet]. 2013; 124(3): 471-4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19445426>.
13. Tadesse M, Aragaw D, Rigouts L, Abebe G. Increased detection of smear-negative pulmonary tuberculosis by GeneXpert MTB/RIF® assay after bleach concentration. *Int J mycobacteriology* [Internet]. 2016; 5(2): 211-8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27242234>.
14. Ceyhan I, Simşek H, Tarhan G. [Comparison and evaluation of Lowenstein-Jensen medium and 2% Ogawa medium for the diagnosis of tuberculosis]. *Mikrobiyol Bul* [Internet]. 2012; 46(1): 33-8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22399169>.
15. Costa RR, Silva SF, Fochat RC, et al. Comparison between Ogawa-Kudoh and modified Petroff techniques for mycobacteria cultivation in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Einstein (São Paulo)* [Internet]. 2018; 16(2): eA04214. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29898027>.
16. Best M, Sattar SA, Springthorpe VS, Kennedy ME. Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1990; 28(10): 2234-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2121783>.
17. Githui WA, Matu SW, Tunge N, Juma E. Biocidal effect of bleach on *Mycobacterium tuberculosis*: a safety measure. *Int J Tuberc Lung Dis* [Internet]. 2007; 11(7): 798-802. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17609057>.
18. Lawson L, Yassin MA, Ramsay A, et al. Microbiological validation of smear microscopy after sputum digestion with bleach; a step closer to a one-stop diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* [Internet]. 2006; 86(1): 34-40. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16263328>.

AUTOR CORRESPONDENTE

Nilma Cintra Leal  0000-0001-9769-7630
e-mail: nilma@cpqam.fiocruz.br



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.